

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-513187

(43) 公表日 平成10年(1998)12月15日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 47/48

Z

C 0 7 D 305/14

C 0 7 D 305/14

// C 0 7 D 491/22

491/22

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願平8-523755
(86) (22) 出願日 平成8年(1996)1月30日
(85) 翻訳文提出日 平成9年(1997)7月25日
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 6 / 0 1 4 5 9
(87) 国際公開番号 W O 9 6 / 2 3 7 9 4
(87) 国際公開日 平成8年(1996)8月8日
(31) 優先権主張番号 0 8 / 3 8 0 , 8 7 3
(32) 優先日 1995年1月30日
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(31) 優先権主張番号 0 8 / 5 3 7 , 2 0 7
(32) 優先日 1995年9月29日
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

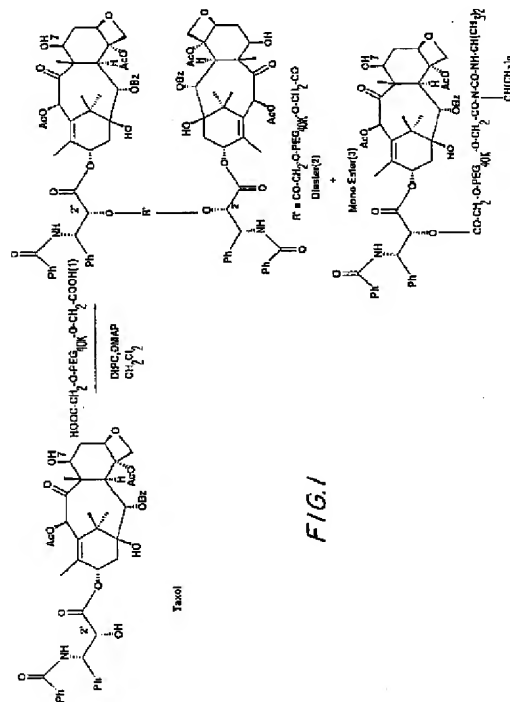
(71) 出願人 エンゾン, インコーポレーテッド
アメリカ合衆国 08854 ニュージャージー
州 ビスカタウェイ, キングスブリッジ
ロード 20
(72) 発明者 グリーンワルド, リチャード ビー.
アメリカ合衆国 08873 ニュージャージー
州 サマーセット, ヒッコリー ロード
113
(72) 発明者 ペンドリ, アナブーナ
アメリカ合衆国 07747 ニュージャージー
州 マタワン, ウィンストン ドライブ
108
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高分子量のポリマーを基剤とするプロドラッグ

(57) 【要約】

一般式(I)の高分子量、水溶性のプロドラッグにおいて、Dは生体活性基；MはXまたはQ；Xは電子求引性基；QはY'から5または6原子離れた位置に自由電子対を有する基；YおよびY'は酸素またはイオウ；および、Rはポリアルキレンオキシドであるものを開示する。この化合物を製造する方法およびこの化合物を用いる治療法もまた開示する。



【特許請求の範囲】

1. 下記の一般式からなる組成物：



ここで、

Dは、生体活性基、

Mは、XまたはQ、

Xは、電子求引性基、

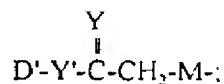
Qは、Y'から5または6原子離れた位置に自由電子対を有する基、

YおよびY'は、独立にOまたはS、

Rは、ポリアルキレンオキシドである。

2. Rがさらにキャップ形成基Zを含む、請求項1記載の組成物。

3. Zが、OH、C₁₋₄アルキル基または、



において、D'は、Dと同一の、または異なる生体活性基であるもののうちのいずれか一つである、請求項2記載の組成物。

4. Xが、O、OC(O)CH₂、N(L)C(O)、C(O)N(L)、C(O)、N(L)、S、SOおよびSO₂（ここで、Lは、H、C₁₋₈アルキル、シクロアルキル、アリールおよびアラルキルからなる群から選択される）からなる群から選択される請求項1記載の組成物。

5. YおよびY'がOである、請求項1記載の組成物。

6. XがOである、請求項1記載の組成物。

7. Xが-NHC(O)である、請求項1記載の組成物。

8. Qが、C₂₋₄アルキル、シクロアルキル；NH(L)、OHおよびSH（ここで、Lは、H、C₁₋₈アルキル、アリールおよびアラルキルからなる群から選択される）からなる群の中のいずれかで置換されたアリール、アラルキル基からなる群から選択される、請求項1記載の組成物。

9. Qが、-CH₂-C(O)-N(H)-、およびオルト置換フェニルからなる群から選択される、請求項8記載の組成物。

10. ポリアルキレンオキシドがポリエチレングリコールからなる、請求項1記載の組成物。

11. ZがCH₃である、請求項2記載の組成物。

12. Zが
$$\begin{array}{c} \text{Y} \\ | \\ \text{D}-\text{Y}'-\text{C}-\text{CH}_2-\text{X}- \end{array}$$
 である、請求項2記載の組成物。

13. Zが
$$\begin{array}{c} \text{Y} \\ | \\ \text{D}-\text{Y}'-\text{C}-\text{CH}_2-\text{Q}- \end{array}$$
 である、請求項2記載の組成物。

14. ポリアルキレンオキシドが、約20,000から約80,000の分子量を持つ、請求項1記載の組成物。

15. ポリアルキレンオキシドが、約25,000から約45,000の分子量を持つ、請求項14記載の組成物。

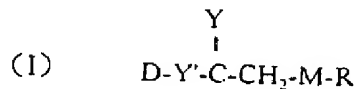
16. ポリアルキレンオキシドが、約30,000から約42,000の分子量を持つ、請求項15記載の組成物。

17. Dが、タキソール、タキサン、およびタキソテルからなる群から選択され、Y'が、上記のDの2'位に結合している、請求項1記載の組成物。

18. Dが、カンプトセシン、エトポシドおよびポドフィロトキシンからなる群から選択される、請求項1記載の組成物。

19. Dが、生体活性タンパク質、酵素、ペプチド、抗腫瘍薬、心血管薬、抗腫瘍薬、抗感染薬、抗カビ剤、抗不安薬、胃腸薬、中枢神経系-活性化薬、鎮痛薬、受胎または避妊薬、抗炎症薬、ステロイド剤、抗尿毒症薬、心血管薬、血管拡張薬および血管収縮薬からなる群から選択される、請求項1記載の組成物。

20. 下記の一般式の組成物を製造する方法で、



ここで、

Dは、生体活性基、

Mは、XまたはQ、

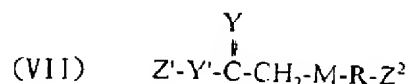
Xは、電子求引性基、

Qは、Y'から5または6原子離れた位置に自由電子対を有する基、

YおよびY'は、独立にOまたはS、および、

Rは、ポリアルキレンオキシドであり、

生体活性基、Dを、下記の一般式のポリマー：



ここで、

M、R、Y、Y'は上記のものと同一であり、

Z'およびZ²の少なくとも一つは、上記のポリマーが上記の生体活性基にエステル結合を介して結合するのに十分な条件のOHであるものと、反応させることからなる製造法。

21. Z'がCH₃である、請求項20記載の方法。

22. XがOである、請求項20記載の方法。

23. QがCH₂-C(O)-N(H)である、請求項20記載の方法。

24. YおよびY'がOである、請求項20記載の方法。

25. ポリアルキレンオキシドがポリアルキレングリコールからなる、請求項20記載の方法。

26. ポリアルキレンオキシドが、約20,000から約80,000の分子量を持つ、請求項20記載の方法。

27. ポリアルキレンオキシドが、約25,000から約45,000の分子量を持つ、請求項26記載の方法。

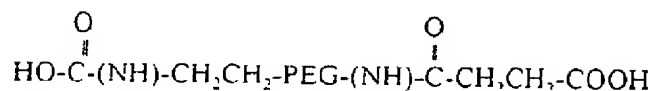
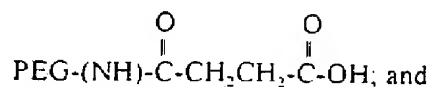
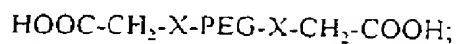
28. ポリアルキレンオキシドが、約30,000から約43,000の分子量を持つ、請求項27記載の方法。

29. Dが、タキソール、タキサンまたはタキソテルからなる群から選択され、Y'が、上記のDの2'位に結合している、請求項20記載の方法。

30. Dが、カンプトセシン、エトポシド、Bおよびポドフィロトキシンからなる群から選択される、請求項20記載の方法。

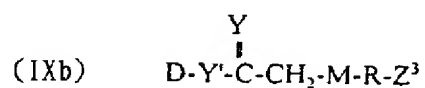
31. 一般式(VII)のポリマーが、以下の構造式のポリマーからなる群から選択

される、請求項20記載の方法。



32. 治療の必要に応じて、有効な量の請求項1に記載のプロドラッグ組成物を哺乳類に投与することからなる、生体活性基を有するプロドラッグを用いて哺乳類を効果的に治療する方法。

33. 下記の一般式からなる組成物：



ここで、

Dは、生体活性基、

Mは、XまたはQ、

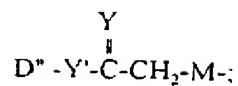
Xは、電子求引性基、

Qは、Y'から5または6原子離れた位置に自由電子対を有する基、

YおよびY'は、独立にOまたはS、

Rは、ポリアルキレンオキシド、および、

Z³は、

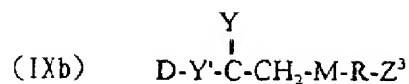


において、D''が、ジアルキル尿素、OC₁₋₄アルキル基またはカルボン酸からなる群から選択されるものである。

34. Dがカンプトセシン類似物である、請求項33記載の組成物。

35. Dがタキサン類似物である、請求項33記載の組成物。

36. 下記の一般式の組成物を製造する方法で、



ここで、

Dは、生体活性基、

Mは、XまたはQ、

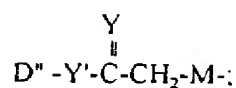
Xは、電子求引性基、

Qは、Y'から5または6原子離れた位置に自由電子対を有する基、

YおよびY'は、独立にOまたはS、

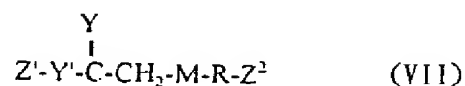
Rは、ポリアルキレンオキシド、および、

Z³は、



において、D''が、ジアルキル尿素、C₁₋₄アルキル基またはカルボン酸からなる群から選択されるものであり、

生体活性基、Dを、下記の一般式のポリマー：



ここで、

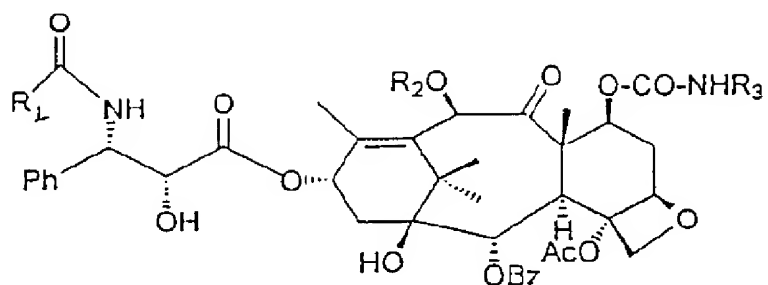
M、R、Y、Y'は上記のものと同一で、

Z'およびZ²は、OHであるもの

と、上記のポリマーが上記の生体活性基にZ'およびZ²の一方を置換したエステル結合を介して結合し、他方のZ基がZ³に変化するのに十分な条件下で反応させる製造法。

37. 治療の必要に応じて、有効な量の請求項33に記載のプロドラッグ組成物を哺乳類に投与することからなる、生体活性基を有するプロドラッグを用いて哺乳類を効果的に治療する方法。

38. 下記の一般式の組成物：



ここで、

R_1 は、 C_6H_5 または $(CH_3)_3CO$ 、

R_2 は、 H または CH_3CO 、および、

R_3 は、アルキル、アラルキルまたはヘテロアルキルである。

39. R_3 がフェニルである、請求項31記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

高分子量のポリマーを基剤とするプロドラッグ

発明の属する技術分野

本発明は水溶性プロドラッグに関する。特に、本発明は比較的高分子量の非抗原性のポリマーをプロドラッグの製造に利用することに関する。

発明の背景

長年にわたり、生物学的に効果のある物質を哺乳類に投与するいくつかの方法が提案されてきた。多くの医薬は水溶性の塩として利用可能であり、比較的容易に薬物製剤に含有させることができる。目的の医薬が水性の液体に不溶性である場合、または生体内で速やかに分解される場合に問題が生じる。アルカロイドは特に可溶化が困難であることが多い。

例えば、水に溶けないパクリタキセル(paclitaxel) (タキソール(Taxol), (登録商標) Bristol-Myers Squibb Co. NY, NY としても知られている) の投与に関する問題を克服するためにいくつかの方法が提案されてきた。最近では、タキソールは非水系賦形剤のクレモファー(cremophor)-ELとの物理的混合物の形で投与される。けれども、この製剤にはいくつかの欠点がある。この賦形剤は過敏症反応を伴い、また、この賦形剤を用いた薬剤の静脈内投与は速度が遅く、患者に苦痛を与える。タキソールの水溶性を増加させるためのいくつかの方法が提案されてきた。例えば、PCT WO 93/24476、米国特許第5,362,831号、およびNicolaou, et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. (1994) 33, No.15/16, 1583-1587ページを参照されたい。水溶性のプロドラッグの製造に関しても検討が行われている。

プロドラッグは、生体活性な親化合物の化学的な誘導体を含み、投与されると、生体内で生体活性な親化合物を遊離する。プロドラッグを用いると生体内での作用の開始および/または持続時間を修正することができる。これに加えて、プロドラッグを用いると、体内における薬物の輸送、分布または溶解性を変えることができる。さらに、プロドラッグにより毒性を減少させたり、その他薬物製剤を投与する際に生じる困難を克服することができると考えられる。

プロドラッグの製法の典型的な例としては、アルコールまたはチオアルコール

の有機リン酸エステルまたはエステルへの変換が挙げられる。Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., A. Osol, Ed. (1980)中の記載を参照により本明細書に組み込む。

プロドラッグは、親化合物または活性な化合物の、生物学的に不活性または実質的に不活性な形であることが多い。活性な薬物の放出速度は、変換したエステルまたは他の官能基の加水分解速度を含むいくつかのファクターに影響される。

最近、ポリエチレングリコールおよび関連するポリアルキレンオキシドが、タキソールのプロドラッグの製造のための添加物として使用できることが提案された。例えば、上記PCT WO 93/24476を参照されたい。水溶性および生体内での血液中の寿命を増加させ、抗原性を減少させるために、PEGはタンパク質、ペプチドおよび酵素とも接合された。例えば、米国特許第5,298,643号および第5,321,095号、いずれも、Greenwaldらを参照されたい。これらの後者の二つの参考文献は、とりわけ、ポリアルキレンオキシドと標的基の間に実質的に加水分解抵抗性の結合を有する生体活性なコンジュゲートについて開示している。このように、プロドラッグそのものよりも、長寿命のコンジュゲートが製造された。多くの場合、コンジュゲートに含まれるポリマーの平均分子量は好ましくは約5,000ドルトンであった。

PCT WO 93/24476には、プロドラッグを作るために、タキソールと水溶性のポリエチレングリコールを結合する共有結合としてエステル結合を用いることが記載されている。ところが、出願人は、そこに記載されたエステル結合は、水性の環境において加水分解に対する $t_{1/2}$ が4日より大きいことを発見した。このように、ほとんどのコンジュゲートは生体内で加水分解が行われる前に排泄される。生体内でポリマー-薬物結合がより速く加水分解して、親薬物化合物をより速く生成するようなエステル結合を提供することが望ましい。

驚くべきことに、分子量10,000未満の一つまたは二つのポリマーのみがアルカロイドおよび/または有機化合物と結合した場合には、その結果得られるコンジュゲートは生体内において速やかに排泄されることが見いだされた。実際、このようなコンジュゲートは非常に速やかに体内から除去されるので、たとえ加水分解しやすいエステル結合を用いた場合でも、十分な親分子が生体内において再生

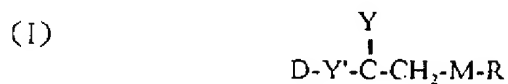
成しないため、PAO-薬物コンジュゲートはプロドラッグとしての価値を持ち得ない。

Ohya, et al., J. Bioactive and Compatible Polymers Vol.10 Jan., 1995, 51-66には、二つの置換基をエステルを含むさまざまな結合基によって結合することにより製造したドキソルビシン(doxorubicin)-PEGコンジュゲートについて記載されている。しかし、用いられたPEGの分子量は、最良の約5,000のみである。これでは、結合が十分に加水分解して親分子を生成する前にコンジュゲートが実質的に排出されるので、生体内における本当の利益は実現されない。Yamaoka, et al. J. Pharmaceutical Sciences, Vol. 83, No.4, April 1994, 601-606ページには、修飾されていないPEGのIV投与後のマウスの血液中の半減期が、分子量を6,000から190,000に増加させると、18分から1日に延びることが記載されている。しかしながら、Yamaokaらはポリマーを薬物に結合する効果は薬物の側にあるかもしれない点を考慮しなかった。また、Yamaokaらは、高分子量のポリマーの水溶液は、非常に粘性が高く、薬物製剤の投与に用いられる狭い管を有する装置を通して施すのが困難であることを考慮しなかった。

要約すると、親薬物化合物と水溶性のポリマーとのコンジュゲートに基づく従来のプロドラッグは、親薬物からのポリマーの極端に遅い加水分解と、体内からのプロドラッグの極端に速い除去との両方の性質を持つために、成功していたとはいえない。

発明の概要

本発明は、上に記載した欠点を克服することを目的としている。本発明の一つの態様は、一般式(I)の組成物を提供する。



ここで、

Dは、生体活性基、

Mは、XまたはQ、

Xは、電子求引性基、

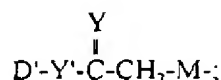
Qは、Y'から5または6原子離れた位置に自由電子対を有する基、

YおよびY'は、独立にOまたはS、および、

Rは、ポリアルキレンオキシドである。

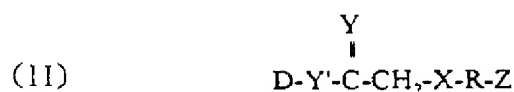
これらの態様においては、ポリアルキレンオキシド、Rは、さらに、基Zにより置換されていてもよく、ここで、

Zは、C₁₋₄アルキル基のようなポリマーキャップ形成基、付加的な生体活性基、または、



において、D'は、Dと同じであるか、異なる生体活性基であるものである。

本発明の好ましい実施態様としては、一般式(II)および(III)の組成物が挙げられる。



プロドラッグは水溶性のポリアルキレンオキシドポリマー（ここではRで示す）を含む。特に、Rは、好ましくはポリエチレングリコールで、少なくとも約20,000の分子量を持つ。

本発明のプロドラッグ組成物は、好ましくは活性化されたエステル結合のような加水分解可能な結合を介して水溶性のポリマーに結合した、1またはそれ以上の活性な化合物を含む。このように、本発明はモノ-またはビス-ポリマーを基剤とするプロドラッグを意図する。

本発明の一つの好ましい態様においては、ポリマーに結合した活性なまたは親化合物（ここではDで示す）は、タキソールまたはタキソテル(taxotere)のようなタキサンである。本発明の他の態様においては、活性なまたは親化合物は、カンプトセシン、エトポシドまたはポドフィロトキシンである。さらに別の実施態様においては、ステロイド化合物をはじめとする抗炎症薬のような非腫瘍崩壊性薬、また、インシュリンのような治療用の低分子量ペプチドであってもよい。

本発明の化合物の主な利点の一つは、プロドラッグが、結合の加水分解速度とプロドラッグの体内からの除去速度との間の適正なバランスを達成したことである。ポリマーと、ここで生体活性な求核試薬とも呼ぶ親化合物の間の結合は、プロドラッグが血漿または体内から除去される前に、生体内において十分な量の親分子を放出することができるような速度で加水分解する。

ここに記載された組成物の製造法および使用法もまた提供される。

図面の簡単な説明

図1は、実施例2に記載された反応を表す反応式である。

図2は、実施例4に記載された反応を表す反応式である。

図3は、実施例6に記載された反応を表す反応式である。

図4は、実施例7に記載された反応を表す反応式である。

図5は、実施例8、9および10に記載された反応を表す反応式である。

図6は、実施例11に記載された反応を表す反応式である。

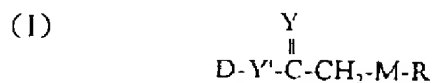
図7は、実施例17に記載された反応を表す反応式である。

発明の詳細な説明

A. プロドラッグ

本発明のプロドラッグ組成物は、ポリマー部分と、生体活性な求核試薬、すなわち天然のまたは修飾していない薬物から誘導された生体活性基との間の加水分解可能な結合を含む。この結合は、好ましくは適当な時間内に十分な量の生体活性親化合物を生成するような速度で加水分解するようにデザインされたエステル結合である。本発明の目的のためには「十分な量」という用語は、治療上の効果をあげるような量を意味する。

本発明の一つの態様において、本発明のプロドラッグは下に記載する一般式(I)で表されるものである。



ここで、

Dは、生体活性基、

Mは、XまたはQ、

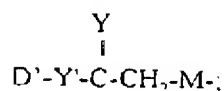
Xは、電子吸引性基、

Qは、Y'から5または6原子離れた位置に自由電子対を有する基、

YおよびY'は、独立にOまたはS、

Rは、ポリアルキレンオキシドである。

好ましくは、Rで表されるポリマー部分はさらに以下のものから選択される基Zで置換されている。すなわち、Zは、ポリマーキャップ形成基、生体活性あるいは不活性基、OH、C₁₋₄アルキル基、または



において、D'が、Dと同一であるか、異なる生体活性基または上に記載したようなキャップ形成基であるものの中から選択される。

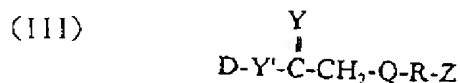
一般式(I)において、YおよびY'は、好ましくは酸素である。

Mが、下に記載するXである場合、



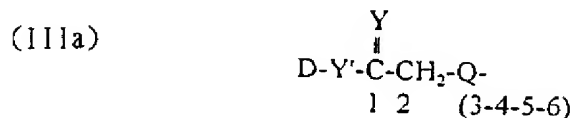
Xは、プロドラッグのエステルの加水分解により、約4.0未満のpKaを有する置換された酢酸を生成するような電子求引性基である。このようなXとしては、O、OC(O)CH₂、-N(L)-C(O)-、-C(O)-N(L)、C(O)、N(L)、S、SOまたはSO₂で、Lが、H、C₁₋₈アルキル、シクロアルキル、アリールおよびアラルキルからなる群より選択されるものを挙げることができる。上記アルキルとしては直鎖または分枝鎖アルキルが適しており、メチルが好ましい。アリールとしてはフェニルまたは置換フェニルが適しており、アラルキルとしては、ベンジルが適している。Xは、好ましくは、O、-N(H)C(O)-またはSあるいはSO₂のいずれか一つである。

Xとして選択された基は、加水分解の結果生じる置換された酢酸のpKaが低いため、比較的速い加水分解を促進する。本発明の別の実施態様として、一般式(III)の組成物が提供される。



ここで、

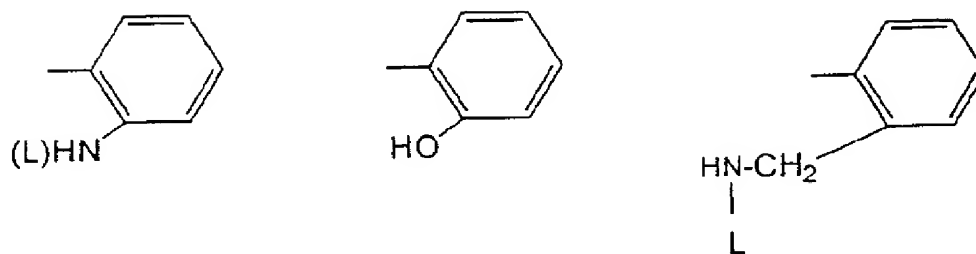
D、Y'、Y、RおよびZは、上記一般式(I)において記載したものと同一であり、Rは、ヘテロ原子、好ましくはOを介してQに結合していることが好ましい。Qは、下の一般式(IIIa)に示すように、Y'から3から6原子離れた位置に自由電子対を有する基である。



好ましい実施態様においては、自由電子対はY'から5原子の位置にある。Qは、OH、SHおよびNH(L)（ここで、LはC₁₋₁₈アルキル、シクロアルキル、アリールまたはアラルキルである）からなる群の一員で置換されたC₂₋₄アルキルまたはシクロアルキル、アリールまたはアラルキル基から選択される。自由電子対とY'の間隔が定義された通りに維持される限り、自由電子対はQ基のどこにあってよい。

Qとして特に好ましい基としては、

-CH₂-C(O)-N(H)-、および、下記のようなオルト置換フェニル基、

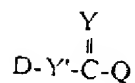


が挙げられる。

これらの実施態様において、R-Z部分は、L、すなわちヘテロ原子(O,N,S)またはアリール基を介して結合していてもよい。自由電子対を有する基はエステルの加水分解の際に三から六員環、好ましくは五員環の副生成物を生成させることができるので、一般式(III)のQは、近接性補助によりプロドラッグのエステルの加水分解を促進する働きをする。

本発明のまた別の態様においては、下記の一般式(IIIb)に示されるように、一般式(III)におけるメチレン基が存在しない。

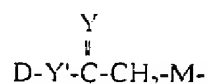
(IIIb)



この態様において、自由電子対とY'の間の間隔は、上で定義された通りである。

一般式(II)および(III)のどちらにおいても、Zは水溶性ポリアルキレンオキシドポリマーの末端の置換を表す。プロドラッグが生体活性基を一つ有している場合には、ポリマー末端基としては、ヒドロキシル、CH₃またはC₁₋₄アルキルが適している。一方、一般式(I)のプロドラッグには二置換ポリマーも含まれる。この場合、一般式(I)の場合にはZは一般式(IV)の基である。

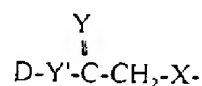
(IV)



ここで、それぞれの可変部は上記の一般式(I)について記載したものと同一である。

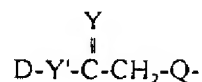
一般式(II)の場合には、Zは一般式(V)の基であり、

(V)



また、一般式(III)の場合には、Zは一般式(VI)の基である。

(VI)



ここで、それぞれの可変部は上記の一般式(II)について記載したものと同一である。

B. 実質的に非抗原性のポリマー

本発明のプロドラッグ組成物は、水溶性ポリマー、Rを含んでいる。このようなポリマーとして適した例としては、好ましくは実質的に非抗原性であるポリエチレングリコールのようなポリアルキレンオキシドが挙げられる。

特に、一置換ポリマーが望まれる場合には、ポリエチレングリコール(PEG)、モノメチル末端ポリエチレングリコール(mPEG)のような活性基が一つで末端がC₁₋₄アルキルであるPAOが好ましい。二置換のプロドラッグが望まれる場合には、活性基が二つあるポリエチレンオキシドが好ましい。所望の加水分解可能な結合を得るために、PEG酸またはPEG二酸のような一または二酸活性化ポリマーを用い

る。適したPAO酸は、mPEG-OHをエチルエステルに変換することにより合成することができる。Gehrhardt, H., et al. Polimer Bulletin 18:487(1987)およ

びVeronese, F.M., et al., J. Controlled Release 10:145(1989)をも参照されたい。別の方法としては、PAO-酸はmPEG-OHをt-ブチルエステルに変換することによっても合成できる。例えば、合衆国特許出願出願番号08/440,732、1995年5月15日出願を参照されたい。前記のそれぞれの文献の記載を参照により本明細書に組み込む。

PAOおよびPEGにはさまざまな分子量を持つものがあるが、最低でも20,000の分子量の領域を持つポリマーが好ましい。本発明の目的のためには、通常、約20,000から約80,000の領域のポリマーが選択される。約25,000から約45,000の分子量が好ましく、30,000から約42,000までが特に好ましい。プロドラッグに含有させるために選択されるポリマーの分子量は、結合が加水分解する間、プロドラッグが十分に血液中に循環するための条件を備えたものでなくてはならない。

ここに含まれるポリマー物質は室温で水溶性であることが好ましい。このようなポリマーの非限定的なリストには、ポリエチレングリコール(PEG)またはポリプロピレングリコールのようなポリアルキレンオキシドホモポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール、それらの共重合体およびそれらのブロック共重合体で、ブロック共重合体の水溶性が保持されているものが含まれる。プロドラッグの形成に有用な好ましいポリマーの一つのタイプとしては、次の一般式のポリマーを挙げることができる。

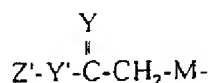


ここで、

Mは、XまたはQ、

Z'は、OHまたはC₁₋₄アルキル、

Z₂は、OH、C₁₋₄アルキル、または、



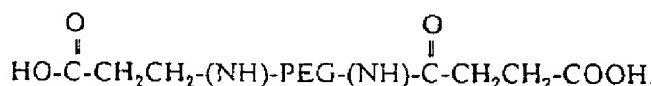
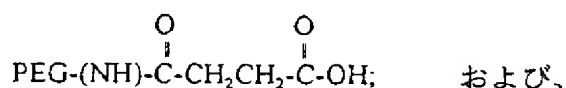
で、M、Q、X、R、YおよびY'のそれぞれは、上記のものと同一であり、Z'およびZ²の少なくとも一つはOHである。

YおよびY'は好ましくは0であり、Rは約20,000またはそれ以上の分子量を有する。

以下のPEG酸およびPEG二酸が特に好ましい。

PEG-X-CH₂-COOH、

HOOC-CH₂-X-PEG-X-CH₂-COOH、



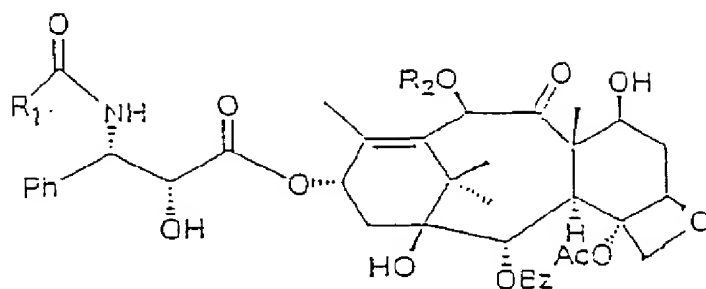
PEGのようなPAOについてここに記載したものと同一タイプのエステル活性化、すなわち、アルコールの2-アルコキシ酸への変換が用いられるならば、PAOを基礎とするポリマーの代わりに、効果的に非抗原性である物質、例えば、デキストラン、ポリビニルアルコール、炭水化物を基礎とするポリマー等を用いることができる。上記のリストは例証的なものでありここに記載された品質を有するポリマー素材ならばどれでも用いることができることは、当業者に理解されるであろう。本発明の目的のためには、「効果的に非抗原性」とは、当該技術分野において、哺乳類に毒性がなく、容易に感知できる免疫反応を引き起こさないことが知られているすべてのポリマー素材を意味する。

C. プロドラッグの候補

1. タキサンおよびタキサン誘導体

本発明のプロドラッグ組成物に含まれる化合物の一つの分類は、タキサンである。本発明の目的のためには、「タキサン」の用語は、テルペンのタキサン群に属する化合物をすべて含むものとする。したがって、タキソール（パクリタキセル）、3'-置換tert-ブトキシ-カルボニル-アミン誘導体（タキソテル）等、ならびに例えば、ミズーリ州セントルイスのSigna Chemicalおよび/またはBristol Myers Squibb から入手可能な他の類似物は、本発明の範囲に入る。代表的なタ

キサンを下に示す。

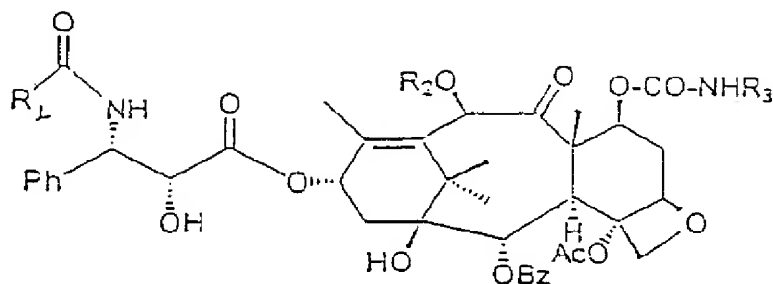


タキソール： $R_1 = C_6H_5$ 、 $R_2 = CH_3CO$

タキソテル： $R_1 = (CH_3)_3CO$ 、 $R_2 = H$

これらの化合物は抗ガン剤として効果を有することが見いだされている。数多くの研究により、この薬はいくつかの悪性のものに対する活性を有することが示されている。現在まで、これらの使用は、とりわけ、その供給が少ない点、水溶性が小さい点および免疫原性のために、きわめて限られていた。タキサンの特に有益な分類の一つは、下記的一般式(VIII)で表される7-アリアルカルバメート類である。

(VIII)



ここで、 R_1 は、 C_6H_5 または $(CH_3)_3CON$ 、

R_2 は、 CH_3CO または H 、

R_3 は、アリアル、アラルキルまたはヘテロアリアルである。

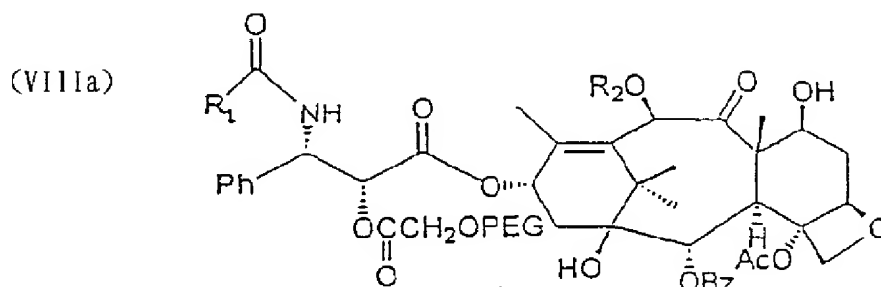
この態様の中で、特に好ましいタキサンは、 R_3 がフェニルのものである。

例証的な目的から、実施例ではとりわけタキソールについて記載するが、ここに記載される方法はすべてのタキサンおよび関連する分子に適していると理解されるべきである。ここで限定されるのは、2'位においてここに記載されるような

修飾を受けることができるようなタキサンを選択しなければならないという点のみである。タキソールは好ましいタキサンである。

本発明のタキサンを基剤とするプロドラッグの形成については、下記のセクションDおよび実施例に記載する。

一般的に、2'位が置換可能なタキサンは、適当に活性化されたPEG酸のようなポリマーと、二つの置換基の間で2'エステル結合の形成をおこすのに十分な条件下で反応する。説明のために例として下にタキソールおよびタキソテルを示す。



プロタキソール : $R_1 = C_6H_5$ 、 $R_2 = CH_3CO$

プロタキソテル : $R_1 = (CH_3)_3CO$ 、 $R_2 = H$

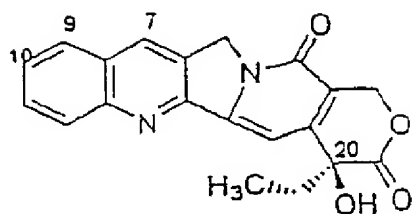
相当するジエステルは、ポリマー二酸に対して少なくとも約2当量のタキサンを反応させることにより製造できる。2当量のタキサンをポリマー二酸と反応させた場合であっても、得られるコンジュゲートにはポリマーに対して少量（すなわち、重量で25%まで）の、ポリマー-タキサン結合の遠位の末端にアシル尿素を含むモノエステル種を含む。本発明のこれらの態様において、ポリマーが少なくとも約20,000の分子量を有することが好ましい。

2. カンプトセシンおよび関連したトポイソメラーゼ I 阻害剤

カンプトセシンは、中国原産の木 *camptoteca accuninata* およびインド原産の木 *nothapodytes foetida* により作られる水不溶性の細胞毒性アルカロイドである。カンプトセシンおよび関連する化合物およびその類似体は、抗がんまたは抗腫瘍剤としての可能性があることも知られており、実験動物により *in vitro* および *in vivo* でこれらの活性を示すことが明らかにされている。カンプトセシンおよび関連する化合物もまた、本発明のプロドラッグに変換する化合物の候補である。たとえば、米国特許第5,004,758号および Hawkins, Oncology, Dec.1992, 17-2

3ページを参照されたい。カンプトセシンおよび関連する類似物は次のような構造を持つ。

(IX)



20(S)-カンプトセシン

カンプトセシン類似物

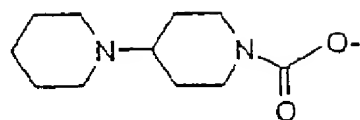
位置

	7	9	10
トポテカン	H	$\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	OH

CPT-11

$-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

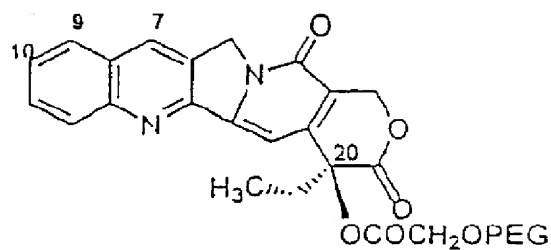
H



モノエステルカンプトセシンプロドラッグは、1当量またはそれ以上の適当に活性化されたポリマーと1当量のカンプトセシン誘導体を、20-OHをエステル結合したポリマーを基剤とするプロドラッグに有効に変換するのに十分な条件下で反応させることにより形成される。カンプトセシンジエステルは、少なくとも約2当量、好ましくはそれ以上のカンプトセシンを適当に製造したPAO二酸と反応させることにより同様に製造する。

エステルでポリマーと結合したカンプトセシンプロドラッグのその他の例としては、図5に示すようなアシルエステル誘導体がある。反応の順序および条件に関する詳細は下記のセクションD、付属する図、および実施例に記載する。

(IXa)



プロ-20(S)-カンプトセシン

プロ-カンプトセシン類似物

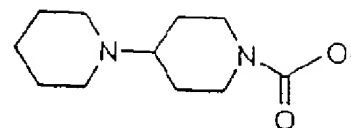
位置

	7	9	10
プロ-トポテカン	H	$\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	OH

プロ-CPT-11

 $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

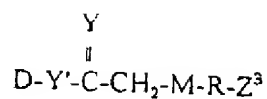
H



上記のカンプトセシン類似物に加えて、驚くべきことに、PEG二酸を用いたときに、新しい20(S)カンプトセシン-モノ-PEGエステル化合物が形成されることが見いだされた。予期に反して、ポリマー二酸は、主にビス類似体を形成すると思われる条件下でカンプトセシンと反応してより多くの割合(予想の>90%)のモノエステルを形成する。ポリマーの α 末端はカンプトセシン-PEGエステルに変換し、 ω 末端は接合の効果を上げるために使用したジアルキルカルボジイミドによって、かなりの量が酸からアシルジアルキル尿素に変換することが見いだされた。実施例15に示すように、この誘導体もin vivoで抗腫瘍活性を示した。さらに、NMRで分析した結果、架橋は無視できる量であると結論された。

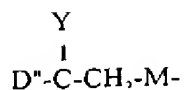
このように、本発明のこの態様においては、カンプトセシン類似物は次の一般式の構造を有する。

(IXb)



ここで、

D、Y、Y'、MおよびRは、上記のものと同一であり、Z³は、



において、D''は、好ましくはジアルキル尿素、C₁₋₄アルコキシまたはカルボン酸からなる群から選択される。

3. その他の生体活性基

上記の分子に加えて、本発明のプロドラッグ製剤は、他の多くの化合物を用いて製造することができる。例えば、エトポシド (VePesid (登録商標), Bristol Myers, New York, NY)、ポドフィロトキシンおよび関連する化合物のような生体活性化合物が含まれる。プロドラッグのエステルは、エトポシドではC-4'ヒドロキシで、ポドフィロトキシンではC-4ヒドロキシで形成される。本発明のポリマーを基剤とするプロドラッグは、水不溶性の化合物に用いるのに特に適しているが、プロドラッグ形成のために選択される親化合物は本質的に水不溶性である必要はない。他の有用な親化合物としては、ある種の低分子量生体活性タンパク質、酵素、およびペプチドグリカンを含むペプチドが挙げられる。また、他の抗腫瘍薬、心血管薬、抗腫瘍薬 (anti-neoplastics)、抗感染薬、抗カビ剤、抗不安薬、胃腸薬、中枢神経系-活性化薬、鎮痛薬、受胎または避妊薬、抗炎症薬、ステロイド剤、抗尿毒症薬 (anti-urecemic agent)、心血管薬、血管拡張薬、血管収縮薬等も挙げることができる。

上の記載は、本発明のプロドラッグに適した生体活性基の例示である。これらの生体活性物質について特定の述べたものではなく、適当なエステル形成基を持つものは、本発明の意図するところであり、これらもまた本発明の範囲に含まれるものと理解されたい。また、本発明のプロドラッグコンジュゲートは一当量の薬物とポリマーのみでなく、生体内で生体活性効果を示さない基をも含んでいてよいと理解されたい。たとえば、いくつかの例においては、一つの結合点を持つ薬物分子と二酸を反応させているにも関わらず、反応条件によってはポリマーに対して二当量の薬物を持ったプロドラッグが得られないことが見いだされている。この場合、プロドラッグはポリマーに対して一当量の薬物しか含まない。アシル尿素のような反応物の副生成物が形成される。さらに、二活性化ポリマーと

の反応にも関わらず、注目すべきことにプロドラッグには架橋された種がないことも見いだされている。

本発明に適した分子のタイプに関して限定されるのは、分子上に少なくとも一か所の加水分解可能な結合ができる位置があり、プロドラッグを投与した後にプロドラッグが生体内で十分な量の親化合物を再生成できるものでなければならない点のみである。

D. プロドラッグの合成

特定のプロドラッグの合成法は実施例に記載する。しかしながら、一般的にはプロドラッグは次のように製造される。すなわち、1)PEG-酸またはPEG-二酸のような活性化されたポリマー、および分子上に加水分解可能な結合を形成することができるような位置を有する親化合物を用意し、2)塩化メチレン、クロロホルムまたはDMFのような不活性な溶媒中で、1,3-ジイソプロピルカルボジイミドまたはSigma Chemicalより入手可能な、あるいは公知の技術を用いて合成した適宜のジアルキルカルボジイミドのようなカップリング試薬および、ジメチルアミノピリジン、ジイソプロピルエチルアミン、ピリジン、トリエチルアミン等のような塩基の存在下、0℃から22℃(室温)までの温度で、二つの置換基を反応させる。別の特定の合成法は実施例に記載する。

E. 治療の方法

本発明の別の態様は、哺乳類のさまざまな医学的な状態に対する治療の方法を提供する。この方法は、有効な量の、ここに記載されたとおりに製造されたタキソール2'-PEGエステルのようなプロドラッグを治療の必要に応じて哺乳類に投与することを含む。この組成物は、とりわけ、哺乳類における腫瘍性疾病の治療、腫瘍の負担の軽減、腫瘍の転移の防止および腫瘍の成長の再発の防止に有効である。

投与するプロドラッグの量はそこに含まれる親分子に依存する。一般的に、治療方法において使用されるプロドラッグの量は、哺乳類に対して目的とする治療結果を効果的に達成するような量である。当然、さまざまなプロドラッグ化合物の用量は、親化合物、生体内での加水分解速度、ポリマーの分子量等によって変化する。しかしながら、一般的にタキサンプロドラッグは、タキサン基の量に基

づいて1日あたり約5から約500mg/m²の範囲の量を投与する。カンプトセシン、エトポシドおよびポドフィロトキシンプロドラッグもまた、1日あたり約5から約500mg/m²の範囲の量を投与する。上記の範囲は例として記載したもので、選択したプロドラッグの最適の用量は、当業者が臨床上の経験と治療の指示に基づいて決定できる。

本発明のプロドラッグは、哺乳類への投与にあたって、一またはそれ以上の適当な製剤組成物に含ませることができる。製剤組成物は溶液、懸濁液、錠剤、カプセル等の形であってよく、当技術分野において公知の方法にしたがって調製される。このような組成物の投与は、必要に応じて経口および/または非経口の経路を選択できる。しかし、発明の好ましい態様においては、プロドラッグは必要に応じて哺乳類に非経口投与される。

F. 実施例

以下の実施例は、発明の理解を高めるために記載するものであって、発明の有効な範囲を限定することを目的とするものではない。実施例1-17では、図1-7に記載した反応式中の化合物に対応した数字を括弧の中に記載した。

実施例 1

PEG(40 kDa)ジカルボン酸(1)

PEGジオール(50g、1.3mmol)のトルエン(750ml)溶液を共沸させ、150mlの流出物を除去した。反応混合物を30℃まで冷却した後、1Mのカリウムt-ブトキシドのt-ブタノール溶液(4ml、4.0mmol)を加えた。得られた混合物を室温で1時間攪拌した後、ブromo酢酸エチル(1.6ml、14mmol)を加えた。溶液を加熱還流した後室温で18時間攪拌した。反応混合物をセライトで濾過し、溶媒を減圧除去した。残渣を塩化メチレン/エーテルから再結晶して、PEG(40 kDa)ジエチルエステル(45.2g、86%)を得た。¹³C NMR: C=O, 170.9ppm。

ジエステル(20g、0.5mmol)を1N水酸化ナトリウム(100ml)に溶かし、室温で4時間攪拌した。塩基性の溶液を氷浴で冷却し、2N HClでpH3.0に調整し、塩化メチレンで3回抽出した。抽出物を集めて水で洗浄し、15mlに濃縮し、溶液を攪拌しながらエチルエーテル(200ml)に加えた。沈殿を濾過し、エーテルで洗浄し、乾燥して2-プロパノールから結晶化して二酸(1)(16.9g、84%)を得た。¹³C NMR

: 68.05, 68.1-71(PEG)170.93。

実施例 2

タキソール-2'-PEG40kDaエステル(2+3)

PEG40kDa二酸(1)(5g、0.125mmol)を室温で20mlの無水塩化メチレンに溶かし、この溶液に0℃でDIPC(52.2 μ l、0.34mmol)、DMAP(64mg、0.523mmol)およびタキソール(292mg、0.34mmol)を加えた。反応混合物が室温に温まるまで放置して、さらに16時間放置した。この溶液を0.1N HClで洗浄し、乾燥し、減圧下で蒸発させて白色の固体を得て、これを2-プロパノールから再結晶した。生成物(収率80-90%)はジエステル(2)とモノエステル(3)の混合物であることが判明した。これらの化合物の構造は ^{13}C および ^1H NMR分析により確認された。モノエステルのジエステルに対する比は、下に記載するUVアッセイにより定量されて、1:2であることがわかった。通常のクロマトグラフィーおよび結晶化の技術を用いて分子量が近似したPEG誘導体化合物を区別するのは困難なので、エステル混合物の分離は試みなかった。in vivoおよびin vitroの試験の目的には、混合物をそのまま用いた。

^1H NMR(270 MHz, CDCl_3) δ 1.1(s), 1.19(s), 1.21(s), 1.26(s), 1.39(s), 1.42(s), 1.75(s), 1.8(s), 1.9(s), 2.2(s), 2.24(s), 2.51(s), 2.54(s), 3.39(m), 3.59-3.71(br s, PEG), 3.91(s), 4.2-4.4(m), 4.5-4.6(m), 5.0(d, $J = 8\text{MHz}$), 5.6(m), 5.8(d, $J = 5.4\text{MHz}$), 6(m), 6.2-6.4(m), 7.3(s), 7.4-7.7(m), 7.8(d, $J = 8.1\text{MHz}$), 8.2(d, $J = 8.1\text{MHz}$).

^{13}C NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 9.40, 14.61, 20.0, 20.64, 21.92, 22.0, 22.54, 26.63, 35.37, 42.0, 42.99, 45.39, 47.0, 52.71, 58.30, 68.0, 70.38, 71.91, 74.19, 74.91, 75.39, 78.91, 80.86, 84.23, 126.72, 127.10, 128.38, 128.56, 128.88, 129.04, 130.05, 131.67, 132.61, 133.58, 136.73, 142.54, 152.7, 166.80, 167.17, 167.66, 169.65, 169.82, 170.98, 203.61.

実施例 3

タキソール-PEG40kDaエステル(2+3)の分析

塩化メチレン中の天然のタキソールの227nmにおけるUV吸光度を、4から21 μM の範囲の5つの異なる濃度で測定した。吸光度の標準プロット対濃度から計算すると、タキソール(2+3)の吸収係数は、 $2.96 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。タキソ

ール-PEG40kDaエステルを塩化メチレンにおおよそその濃度4 μ Mで溶解し、これらの化合物の227nmにおけるUV吸光度を測定した。この値を用い、上で求めた吸収係数を採用してサンプル中のタキソールの濃度を決定した。そして、この値をタキソール-PEGエステル濃度で割るとタキソールのエステル中における割合(%)が得られる。

実施例 4

カンプトセシン-20-PEG40kDaエステル (4a+4b)

PEG40kDa二酸(1)(11.5g、0.287mmol)を室温で200mlの無水塩化メチレンに溶かし、この溶液に0℃でDIPC(0.175ml、1.15mmol)、DMAP(140mg、1.15mmol)およびカンプトセシン(399mg、1.15mmol)を加えた。反応混合物が室温に温まるまで2時間放置し、さらに16時間放置した。この溶液を約100mlに濃縮してセライトで濾過し、濾液を0.1N HClで洗浄し、乾燥(無水MgSO₄)し、減圧下で蒸発させた。得られた白色の固体をDMF/エーテルから再結晶した後、2-プロパノールで洗浄した。生成物(9.52g、収率82%)は、モノおよびジエステル(4aおよび4b)の混合物で、モノエステル(4a)の反対側の末端にはN-アシルジイソプロピルウレイド基を有することがわかった。この化合物の構造は¹³CNMR分析により確認された。先の実施例に記載したUV法を用いて生成物中のカンプトセシンの割合(%)を定量して、カンプトセシンはPEG分子に対して1.35当量であることが示された。これは、モノエステル対ジエステルの比が1.8:1であることを意味する。

¹³C NMR (270 MHz, CDCl₃) δ 7.25, 19.6, 22.3, 31.4, 42.5, 46.38, 48.68, 53.48, 62.8, 66, 67-71(PEG), 75, 94.21, 118.8, 127.2, 127.4, 127.5, 127.65, 128.5, 129.5, 130.5, 144.48, 145.67, 151.5, 152.7, 156.53, 166.2, 168.78.

実施例 5

PEG40kDaグリシン(5)

PEG40kDa二酸(1)(9.5g、0.23mmol)を室温で20mlの無水塩化メチレンに溶かし、0℃でこの溶液にDIPC(141 μ l、0.92mmol)、DMAP(197mg、1.6mmol)およびグリシン- α -ブチルエステル(176.4mg、0.92mmol)を加えた。反応混合物を室温に温まるまで3時間放置し、さらに16時間放置した。溶液を0.1N HClで洗浄し、乾燥し

、減圧下蒸発させてPEG40kDaグリシン ϵ -ブチルエステルを白色固体として得た。
こ

れを塩化メチレン(50ml)とトリフルオロ酢酸(25ml)の混合物に溶かして0℃で一晩おいた。溶媒を除去して固体を塩化メチレン/エーテルから再結晶して(5)(7.1g、75%)を得た。

^{13}C NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 39.42, 69.59, 70.19, 169.39, 169.46.

実施例 6

20-PEG40kDa グリシニルカンプトセシン(6)

PEG40kDaグリシン(5)(2g、0.05mmol)を室温で20mlの無水塩化メチレンに溶かし、0℃でこの溶液にDIPC(38.1 μ l、0.26mmol)、DMAP(92mg、0.75mmol)および20-(S)-カンプトセシン(85mg、0.25mmol)を加えた。反応混合物を室温に温まるまで放置し、さらに16時間放置した。溶液を0.1N HCLで洗浄し、乾燥し、減圧下で蒸発させて(6)を白色固体として得て、これを2-プロパノールから再結晶した。(1.4g, 69%)

実施例 7

2'-PEG40kDaグリシニルタキソール(7)

PEG40kDaグリシン(5)(2g、0.05mmol)を室温で20mlの無水塩化メチレンに溶かし、0℃でこの溶液にDIPC(6.5 μ l、0.1mmol)、DMAP(8.1mg、0.1mmol)およびタキソール(86mg、0.1mmol)を加えた。反応混合物を室温に温まるまで放置し、さらに16時間放置した。溶液を0.1N HClで洗浄し、乾燥し、減圧下で蒸発させて(7)を白色固体として得て、これを2-プロパノールから再結晶した。

実施例 8

20-ブロモアセチルカンプトセシン(8)

カンプトセシン(1g、2.87mmol)の CH_2Cl_2 (700ml)の懸濁液に、ブロモ酢酸(1.2g、8.61mmol)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC、1.3ml、8.61mmol)およびジメチルアミノピリジン(DMAP、0.7g、5.74mmol)を0℃に加えて4時間搅拌を続けた。得られた黄色の溶液を約100mlまで濃縮し、1N 塩酸(10ml \times 2)、次いで1%炭酸水素ナトリウム水溶液(10ml \times 2)で洗浄した。有機層を乾燥(無水 MgSO_4)し、

減圧下蒸発させて黄色の固体を得た。メタノール(10ml)を加え、スラリーを汙過して(8)(0.9g、67%)を黄色の固体として得た。

^1H NMR(270 MHz, CDCl_3) δ 1.0(t), 1.7(s), 2.1-2.5(m), 4.0(q), 5.3(s), 5.4-5.8(dd), 7.25(s), 7.3(s), 7.6-8.5(m).

^{13}C NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 7.51, 24.97, 31.77, 49.97, 67.16, 76.53, 95.73, 120.29, 128.05, 128.39, 129.64, 130.65, 131.17, 144.94, 146.48, 148.84, 152.18, 157.24, 165.97, 166.8.

実施例 9

20-ヨードアセチルカンプトセシン(9)

カンプトセシン(1.06g、3.04mmol)の CH_2Cl_2 (700ml)の懸濁液にヨード酢酸(1.2g、8.61mmol)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC、1.4ml、9.13mmol)およびジメチルアミノピリジン(DMAP、0.74g、6.08mmol)を0℃で加えて4時間搅拌を続けた。得られた黄色の溶液を約100mlまで濃縮し、1N塩酸(10ml×2)、次いで1%炭酸水素ナトリウム水溶液(10ml×2)で洗浄した。有機層を乾燥(無水 MgSO_4)し、減圧下で蒸発させて黄色の固体を得た。これにメタノール(10ml)を加えて、スラリーを搅拌、汉過して(9)を黄色の固体(1.25g、80%)として得た。

^1H NMR(270 MHz, CDCl_3) δ 1.0(t), 2.1-2.6(m), 3.7-4.0(dd), 5.2(s), 5.4-5.8(dd), 7.2-8.5(m).

^{13}C NMR (270 MHz, CDCl_3) δ 7.54, 31.77, 49.98, 67.17, 95.88, 120.32, 128.02, 128.17, 128.41, 129.76, 130.60, 131.12, 145.03, 146.40, 148.91, 152.28, 157.28, 166.98, 167.35.

実施例 10

20-ブロモアセチルカンプトセシンとPEG40kDaジカルボン酸(10)の反応

PEG40kDaジカルボン酸(1)(5g、0.125mmol)を100mlのトルエン中で1.5時間共沸させ、50mlの留出物を除去した。上記の溶液に1.0Mのカリウムtert-ブトキシド(0.274ml、0.28mmol)のt-ブタノール溶液を加えた。反応溶液を1.5時間還流し、次いで溶媒を減圧除去してPEG40kDaジカルボン酸の二カリウム塩を得た。二カリウム塩(1.17g、0.007mmol)のDMSO(10ml)溶液にカンプトセシン-20-ブロモ酢酸(4

1mg、0.0873mmol)を加えて、得られた混合物を40℃に温めて透明な溶液を得た。
室温で一晩攪拌を続け、エーテル(10ml)を加えた。沈殿した固体を濾過し、

塩化メチレンに再度溶かした。有機層を水(5ml)で洗浄し、乾燥(無水MgSO₄)し、
溶媒を減圧下で蒸発させた。得られた固体を2-プロパノールから再結晶して(10)
(0.9g、76.3%)を得た。UV法によりカンプトセシンはPEG分子に対して1.6当量で
あるという結果が得られたが、これは、ジエステル生成物の中にいくらかのモノ
エステルが存在していることを示している。

¹³C NMR (270 MHz, CDCl₃) δ: 7.02, 31.17, 49.58, 53.35, 59.77, 66-73 (PEG), 94.68,
119.41, 127.16, 127.44, 127.53, 127.96, 128.77, 129.77, 130.29, 144.06, 145.84,
148.05, 151.20, 156.14, 166.36, 169.08.

実施例11

ポドフィロトキシシン-4-グリシニルPEG40kDa (11)

PEG40kDaグリシン(5)(2g、0.05mmol)を室温で20mlの無水塩化メチレンに溶か
し、この溶液に0℃でDIPC(27.3μl、0.18mmol)、DMAP(21.9mg、0.18mmol)および
ポドフィロトキシシン(110mg、0.25mmol)を加えた。反応混合物を室温に温まるま
で放置し、さらに16時間放置した。溶液を0.1N HClで洗浄し、乾燥し、減圧下蒸
発させて、(11)を白色固体として得て、これを2-プロパノールから再結晶した。

実施例12

タキソール2'-PEG 5,000モノエステル

A. m-PEG 5,000カルボン酸の製造

m-PEG-OH 5,000をPEGジオールの代わりに用いる以外は実施例1と同様の方法
を繰り返した。

B. タキソール-2' m-PEG 5,000モノエステルの製造

PEG 5,000酸を使用前に共沸させた。このPEG 5,000酸(625mg、0.125mmol)を室
温で20mlの無水塩化メチレンに溶かした。この溶液を0℃で、1,3-ジイソプロピ
ルカルボジイミド(26μl、0.17mmol)、4-ジメチルアミノピリジン(32mg、0.26mm
ol)およびタキソール(146mg、0.17mmol)で処理した。反応溶液を室温に温まるま

で30分放置し、この温度をさらに16時間保った。次いで、反応混合物を0.1N HClで洗浄し、乾燥し、溶媒を蒸発させて白色の固体を得た。これを2-プロパノールから結晶化して585mg(収率80%)の純粋な生成物を得た。

実施例13

20-カンプトセシン m-PEG 5,000エステルの製造

A. PEG 5,000カルボン酸の製造

m-PEG-OH 5,000をPEGジオールの代わりに用いる以外は、実施例1と同様の方法を繰り返した。

B. 20-カンプトセシン m-PEG 5,000エステルの製造

PEG 5,000酸を使用前にトルエン中で共沸した。このPEG 5,000酸(400mg、0.079mmol)を室温で10mlの無水塩化メチレンに溶かした後、0℃で、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(18.1 μ l、0.119mmol)、4-ジメチルアミノピリジン(14.5mg、0.119mmol)および(S)-(+)-カンプトセシン(41.32mg、0.119mmol)で処理した。反応溶液を室温に温まるまで30分間放置し、その温度をさらに16時間保った。次いで反応溶液を0.1N HClで洗浄し、乾燥し、溶媒を蒸発させた。得られた白色がかった固体をクロマトグラフィー(シリカゲル、MeOH/CH₂Cl₂)で精製した。精製された物質をCH₂Cl₂/エーテルから結晶化した。

実施例14

in vitroのバイオアッセイ

この実施例においては、修飾していないタキソール、2'-PEG 5,000-タキソール(実施例12)、修飾していないカンプトセシン、20-カンプトセシンPEG5,000エステル(実施例13)および上に記載された方法で製造された高分子量プロドラッグのいくつかについて、IC₅₀を測定するために一連のin vitroのアッセイをおこなった。修飾されていないタキソールはPHYTO Pharmaceuticals, Inc.より、修飾されていないカンプトセシンはSigma Chemical Co.より入手した。

すべての化合物について、P388/O(マウスリンパ新生物、Southern Research Institute)、HT-29(ヒト結腸癌)、T-47D(ヒト胸腺癌)、SW-48(ヒト結腸腺癌)、A549(ヒト肺腺癌)細胞系に対して独立に試験をおこなった。

P388/O細胞系は、RPMI 1640培地 (Whittaker Bioproducts, Walkersville, Maryland) + 10%FBS (Hyclone, Inc. Logan, UT) 中で培養した。HT-29細胞は、DMEM (GIBCOBRL) + 10%FBS (Hyclone, Inc.) 中で培養した。SW48細胞は、LeibowitzのL-15培地 (GIBCOBRL) + 10%FBS 中で培養した。A549細胞はDMEM/F-12 (Biowhita

ker) + 10%FBS (熱不活性化したもの) 中で培養した。T47-D細胞は、RPMI1640 + 10%FBS + インスリン (10mg/ml) 中で培養した。バイオアッセイは、抗生物質と抗カビ剤 (fungizone) を加えたそれぞれの培地の中でおこなった。カンプトセシン、タキソールおよびポドフィロトキシンをDMSOに溶かして、培地で適当な濃度に希釈した。PEG-カンプトセシン、PEG-タキソールおよびPEG-ポドフィロトキシンプログラッグを水に溶かして培地で適当な濃度に希釈した。

アッセイは96-ウェルマイクロタイター細胞培養プレートで2個ずつおこなった。マイクロタイタープレートに化合物を2倍希釈で加えた。0.1%トリプシン/Verseneを加えて37℃でインキュベートすることにより、細胞を分離した。10%FBSを含むそれぞれの細胞系に適した培地を加えることによりトリプシンを不活性化した。マイクロタイタープレートのそれぞれのウェルに10,000細胞を加えた。3日後、代謝指示色素、Alamar Blueを製造者の指示書に従って加えることにより細胞の成長を測定した。それぞれの試験化合物の IC_{50} 値を測定して適当な参照化合物の IC_{50} と比較した。

化合物	IC ₅₀ (nM)				
	P388	HT-29	T-47D	SW-48	A549
タキソール	6-12				
タキソール-2-PEG5kDaエステル(12)	15				
タキソール-2-グリシニルPEG40kDaエステル(7)	14				
タキソール-2-PEG40kDaエステル(2+3)	10				
カンブトセシン	7-16	40-80	14-19	35-88	300
カンブトセシン-20-PEG5kDaエステル(13)	33-48	100-362			
カンブトセシン-20-PEG40kDaエステル(4a+4b)	17-27	67	34	194	823
カンブトセシン-20-アシルオキシPEG40kDaエステル(10)	15				
カンブトセシン-20-グリシニルPEG40kDaエステル(6)	34				
ポドフィロトキシン	7	21	24	15	24
ポドフィロトキシン-4-グリシニルPEG40kDaエステル(11)	11				
ポドフィロトキシン-4-PEG40kDaエステル(14)	24	55	39-60	116-142	97-127

P-388 - マウス白血病細胞系

HT-29 - ヒト結腸癌細胞系

T-47D - ヒト胸腺癌細胞系

SW-48 - ヒト結腸腺癌細胞系

A549 - ヒト肺腺癌細胞系

表を参照すると、低分子量と比較的高分子量の両方のポリマープロドラッグが、無修飾型の薬物よりも優れていることがわかる。しかしながら、出願人は、驚くべきことに低分子量のポリマープロドラッグを用いたin vitroの結果は、in vivo

o. のテストをおこなったときに得られる結果と一致しないことを発見した。これについては、下の実施例15に記載する。

実施例15

in vivoの研究

この実施例では、Charles River Laboratories, Wilmington, MAから入手した、実験の初めに生後約8-10週となるような40匹の雄のマウスを10匹ずつの4グループに分けた。本発明に従って製造したプロドラッグのin vivoの効果を測定するために、マウスをP388/0マウスリンパ新生物に感染させた。実験はWardらがCancer Chemother. Pharmacol., 31:255-257(1992)に記載した方法に従っておこなった。上記の文献の内容を参照により本明細書に組み込む。研究の目的はプロドラッグのマウスの寿命を延ばす能力を測定することである。

それぞれのマウスに、0日目に 5×10^5 のP388/0細胞を植え付け、続いて5日間連続してそれぞれの薬物で処理した。10匹のマウスには賦形剤(50/50Cremophor EL/エタノール)のみを注射し、10匹のマウスは処理を行わなかった(コントロール)。実験の最終的な終了点は生存することである。結果のデータを下に示す。

薬物	用量/日 μM	総用量 μM	生存率50% までの時間 日	死までの 平均時間 日
コントロール-未処理	0	0	12.5	12.6 \pm 1.2
コントロール-賦形剤	0	0	12.5	12.7 \pm 1.3
タキソール	0.35	1.75	18	18.7 \pm 1.3
2'-PEG 5,000 タキソール (実施例12)(化合物12)	0.35	1.75	12.9	14.1 \pm 2.3
2'-PEG 40,000 タキソール (実施例2)(化合物2+3)	0.35	1.75	19.0	20.3 \pm 1.1
タキソール	1.05	5.25	7.25	7.8 \pm 1.40
2'-PEG 5,000 タキソール (実施例12)(化合物12)	1.05	5.25	15.0	15.7 \pm 2.1
2'-PEG 40,000 タキソール (実施例12)(化合物2+3)	1.05	5.25	5.75	6.3 \pm 0.5
20 カンプトセシン-PEG 40,000 (実施例4)(化合物4a+4b)	0.35	1.75	24.0	24.9
20 カンプトセシン-PEG 40,000 (実施例4)(化合物4a+4b)	0.70	3.50	10.0	29.0

データは以下のように要約することができる。すなわち、すべての化合物は1.75 μmole /マウスの用量で、コントロールよりもマウスの寿命を延ばした。驚くべきことに、2'-PEG 5,000は、この用量ではタキソールに比べて著しく効果が小さい($p < 0.001$)ことが見いだされた。用量を3倍にしても、PEG 5,000プロドラッグ(5.25 μmole /マウス)は親化合物(1.75 μmole /マウスのタキソール)に比べて著しく効果が小さい。一方、PEG40,000二酸を用いて製造したプロドラッグは1.75 μmole /マウスの用量(抗腫瘍活性のために生存が延びる)および5.25 μmole /マウスの用量(毒性のために生存が短くなる)で、親化合物とほぼ同等の効果を

示す。出願人は理論に拘束されるものではないが、高分子量ポリマーと特定のエステル結合の速い加水分解速度との組み合わせによって初めて、プロドラッグが体内から除去される前に治療効果のある量の親化合物が生成することを可能にすると考えられる。

また別に、20-カンプトセシン-PEG 40,000は、コントロールと比較して生存期間をかなり増加させることが観察された。

実施例16

$T_{1/2}$ 加水分解時間

この実施例においては、本発明に従って製造されたプロドラッグのエステル結合の加水分解に対する $t_{1/2}$ を、PCT W093/24476に開示されたエステル結合と比較した。特に、公開されたPCTにおいて化合物(7)として示されたプロドラッグについて、PEG酸を製造するためにmPEG5,000を用いた点のみを変えた化合物と、実施例2の2'-PEGエステルを比較した。

実施例2のプロドラッグ組成物と上記の比較化合物は2'位に以下の置換基を持つように製造された。

タキソール2'-置換基

実施例2： $\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_m-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{O}$

比較： $\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_3$

$m = 909$ 、そのようなPEGの分子量は40,000である。

$n = 114$ 、そのようなPEGの分子量は5,000である。

比較のエステルを有するプロドラッグは、以下の方法で製造した。

a. 比較の2'-mPEG-タキソールエステルの合成

文献(Abuchowski, A., et al., Cancer Biochem Biophys. 7, 175-186(1984))に記載された方法で製造したmPEG MW 5,000コハク酸(SS酸)(300mg、0.0588mmol)とタキソール(75.3mg、0.0882mmol)をトルエン(40ml)とともに2時間共沸させた。20mlのトルエンを除去し、混合物を室温まで冷却して、溶媒をロータリーエバポレーターを用いて減圧除去した。残渣を無水塩化メチレン(10ml)に溶かした後、ジイソプロピルカルボジイミド(11.1mg、0.0882mmol)およびジメチルアミノピ

リジン(10.8mg、0.002mmol)を加えた。反応混合物を室温で一晩攪拌した。次いで、混合物を0.1N HClで洗浄し、溶媒を乾燥し(無水硫酸ナトリウム)、ロータリーエバポレーターで除去した。得られた残渣を2-プロパノールから結晶化して252mgの固体を得た。この物質は目的とする生成物と遊離PEG成分の二つの化合物の混合物であった。混合物を分取HPLCにより、47mm×300mmC8カートリッジカラム(WatersPrepPack)を用いて半径方向圧力600psiで、移動相としてメタノール-水勾配溶離システムを用いて精製した。純粋な生成物(40mg)を、プロトンNMRおよびHPLCで確認した。

それぞれの化合物の加水分解の速度は以下の試験で測定した。

b. pH7.3のリン酸緩衝液中におけるPEG 40,000二酸のビスタキソール2'-エステルの加水分解

実施例2のエステルを、20.3mg/ml(UVアッセイによれば0.5mg/mlのタキソールと当量である)の濃度でpH7.3のリン酸緩衝液に溶解し、37℃に保った。その後、10 μ lのサンプルを1時間ごとに溶液から取り出し、直接HPLCにインジェクトした。タキソールのピークの下の部分の面積を、タキソールについて作製した基準曲線と比較した(量対ピーク面積)。これにより、加水分解により形成されたタキソールの量を計算した。この場合、プロドラッグの半減期、すなわち、プロドラッグの50%が加水分解されるのにかかる時間は、5-6時間であると判明した。

c. ラット血漿中におけるPEG40,000二酸のビスタキソール2'-エステルの加水分解

実施例2のエステルを、生理的なpHであるpH約7.3のラット血漿(非特定的エステラーゼ活性を伴う)に6mg/ml(UVアッセイによれば0.15mg/mlのタキソール

と当量)の濃度で溶解し、37℃に保った。その後、100 μ lずつを一定の時間をおいて取り出し、3×500 μ lの酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて蒸発乾燥させた。残渣を50 μ lのメタノールに溶かしてHPLCにインジェクトした。タキソールのピークの下の部分の面積をタキソールについて作製した基準曲線と比較して、加水分解によって形成されたタキソールの量を計算した。この場合、半減期は1.6時間であると測定されたが、これは、かなりのエステラーゼ活性が存在す

ることを示している。

d. 蒸留水中におけるPEG40,000二酸のビスタキソール2'-エステルの加水分解
ラット血漿の代わりに蒸留水を用いる以外は実施例16cと同一の方法を繰り返した。実施例2の生成物の半減期は96時間よりも大きいことが測定された。

e. 比較の2'-mPEG タキソールエステルの加水分解
ステップaで製造した比較のタキソールプロドラッグを用いてステップb、cおよびdの方法を繰り返した。結果を下に記載する。

加水分解の $t_{1/2}$ (時間)			
プロドラッグ	PBS 緩衝液 (pH 7.3)	ラット血漿 (pH 7.3)	蒸留水 (pH 6.8)
実施例 2	5.0	1.6	>96
比較	>96	>7	>96

表からわかるように、本発明のプロドラッグ製剤は先行技術に示されたものよりもかなり速い加水分解速度を有する。蒸留水、pH6.8の中では、どちらの化合物も本質的に安定であると思われる。エステラーゼが存在する(ラット血漿)、または存在しない(pH7.3のPBS緩衝液) in vivoの環境において、速度の増加は明白であり、また、有効である。この親化合物の再生成は、PAOプロドラッグ化

化合物の in vivoの分析をおこなった後に初めて明らかになるような利点をもたらす。

実施例14で示したように、in vitro試験の結果は、ポリマー結合の加水分解は細胞毒性に効果を与えるのに十分であることを示唆している。ところが、実施例15の in vivo試験は、プロドラッグが血液中にとどまっている間の十分な量の親化合物の再生成が、効果的なプロドラッグ組成物を提供するための鍵であることを明白に示している。そこで、比較的長い加水分解の $t_{1/2}$ を持つエステル結合は、ほとんどの親化合物が in vivoで放出される前に排泄されてしまうため、有効なPAOを基剤とするプロドラッグを提供することができない。この効果は特に比較的低分子量のポリマーを用いたときに顕著である。

実施例17

ポドフィロトキシン-4-PEG40kDaエステル(14)

タキソールの代わりにポドフィロトキシンを用いる他は実施例2と同様の方法を繰り返した。生成物は図7に示した(化合物14)。

【 図 1 】

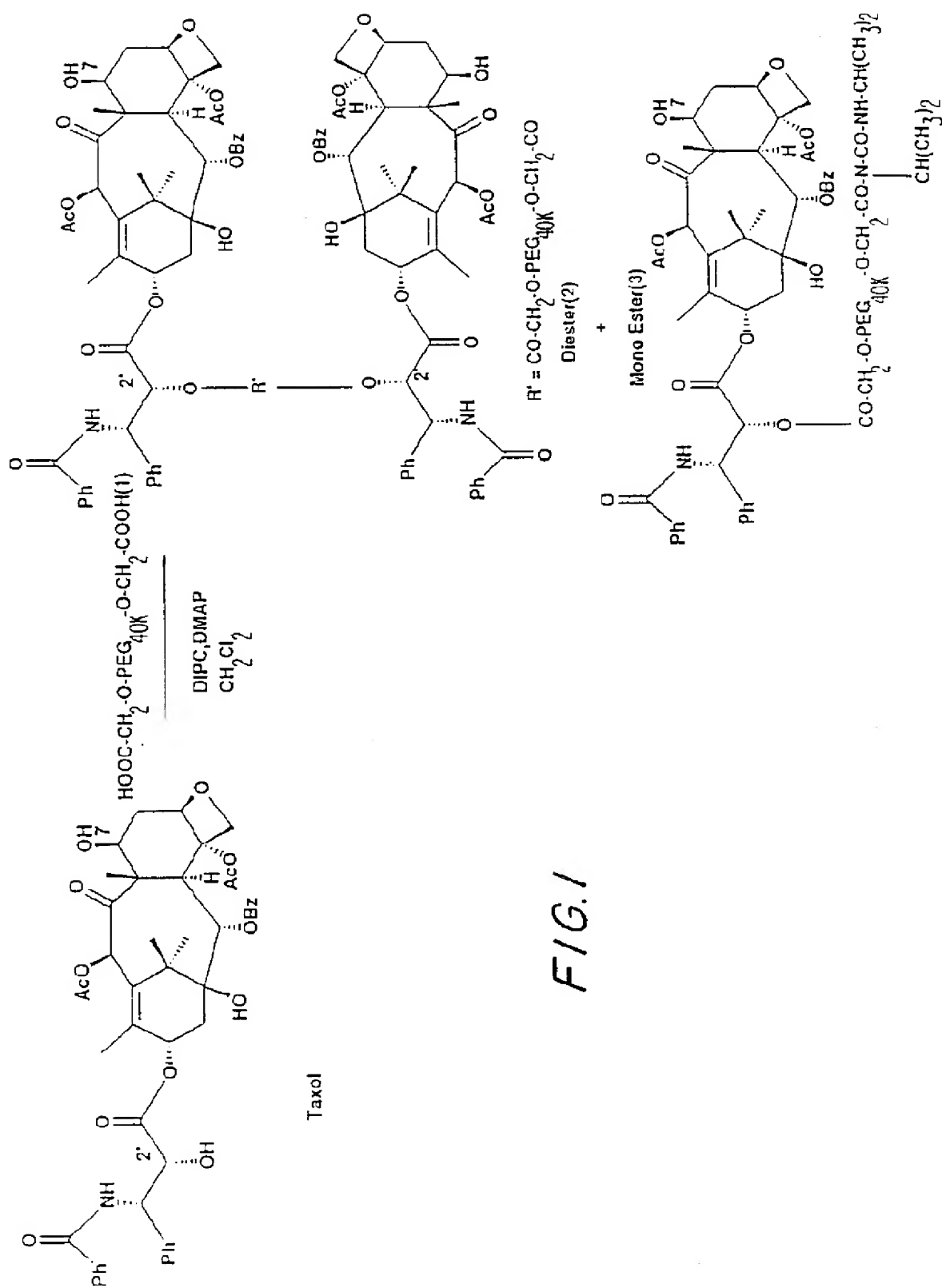
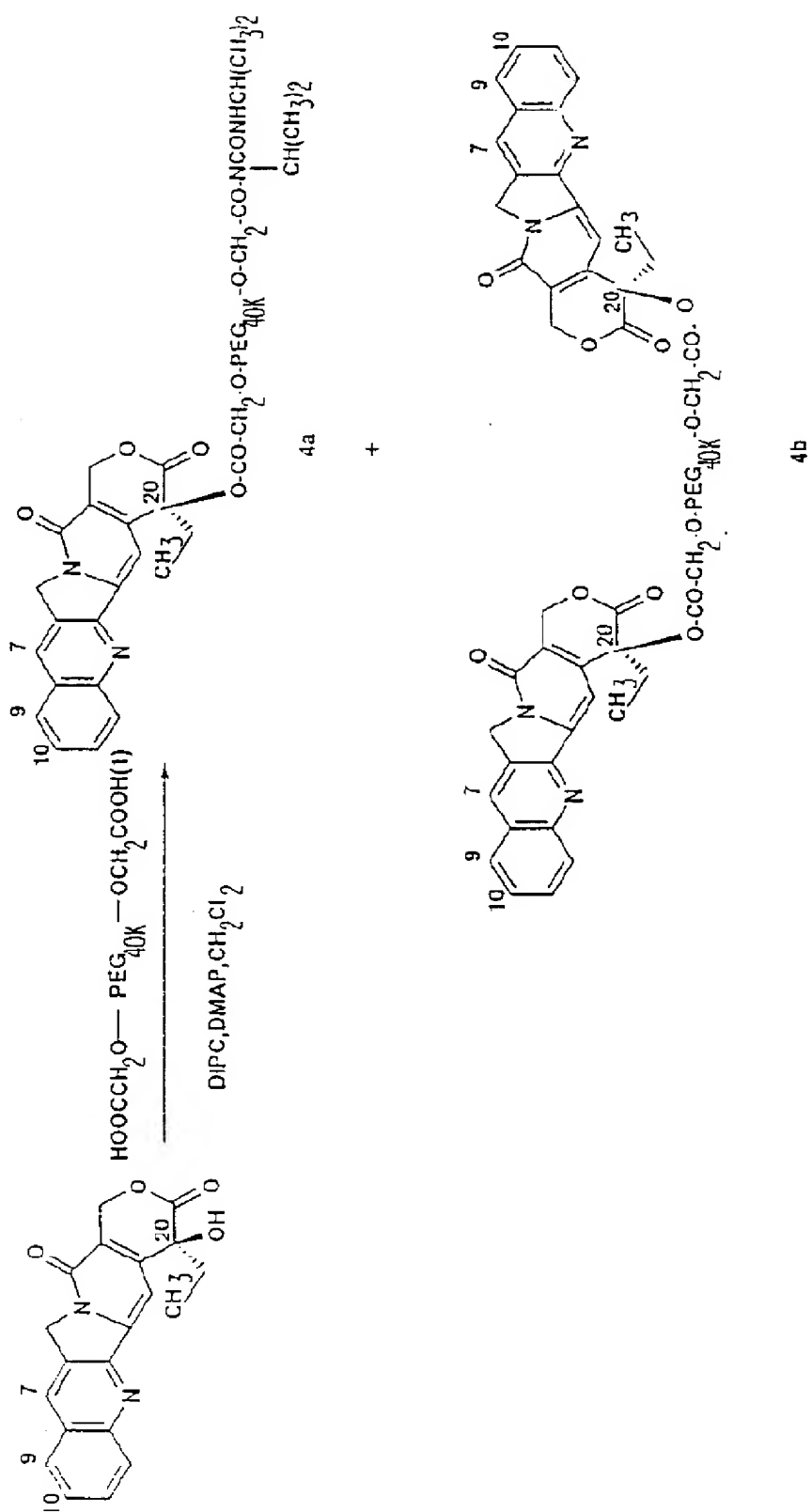


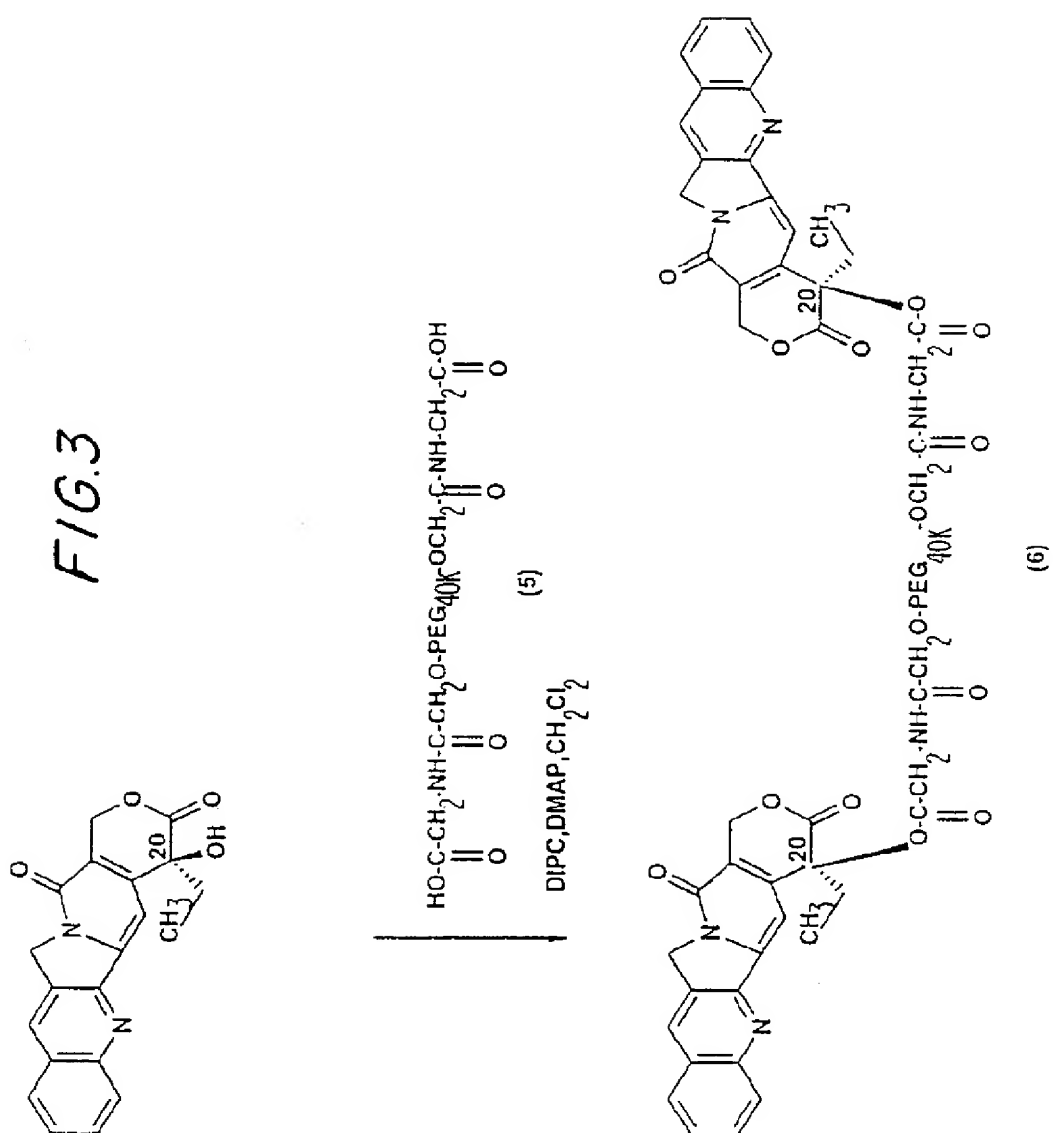
FIG.1

【 図 2 】

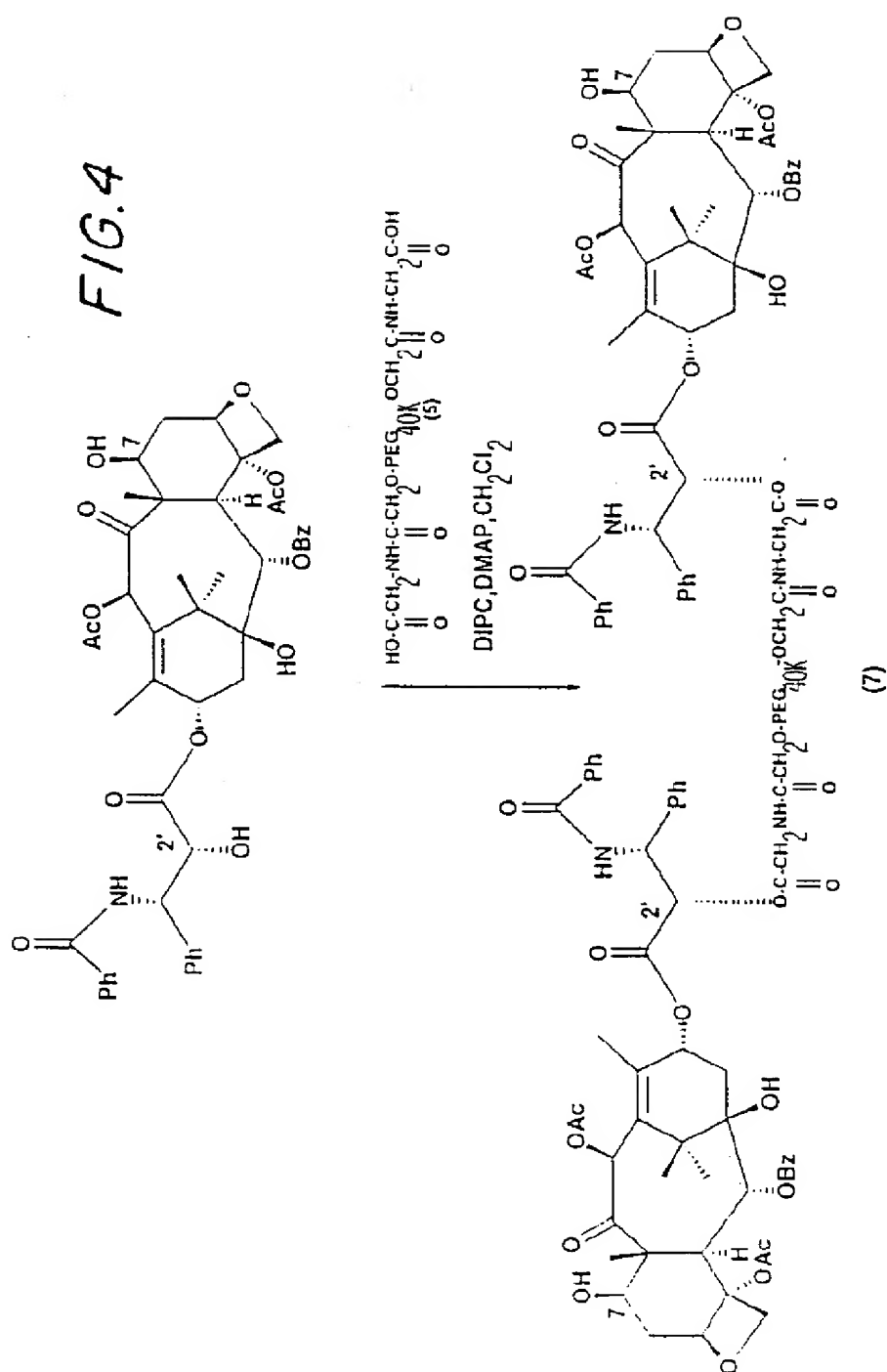
FIG. 2



【图3】

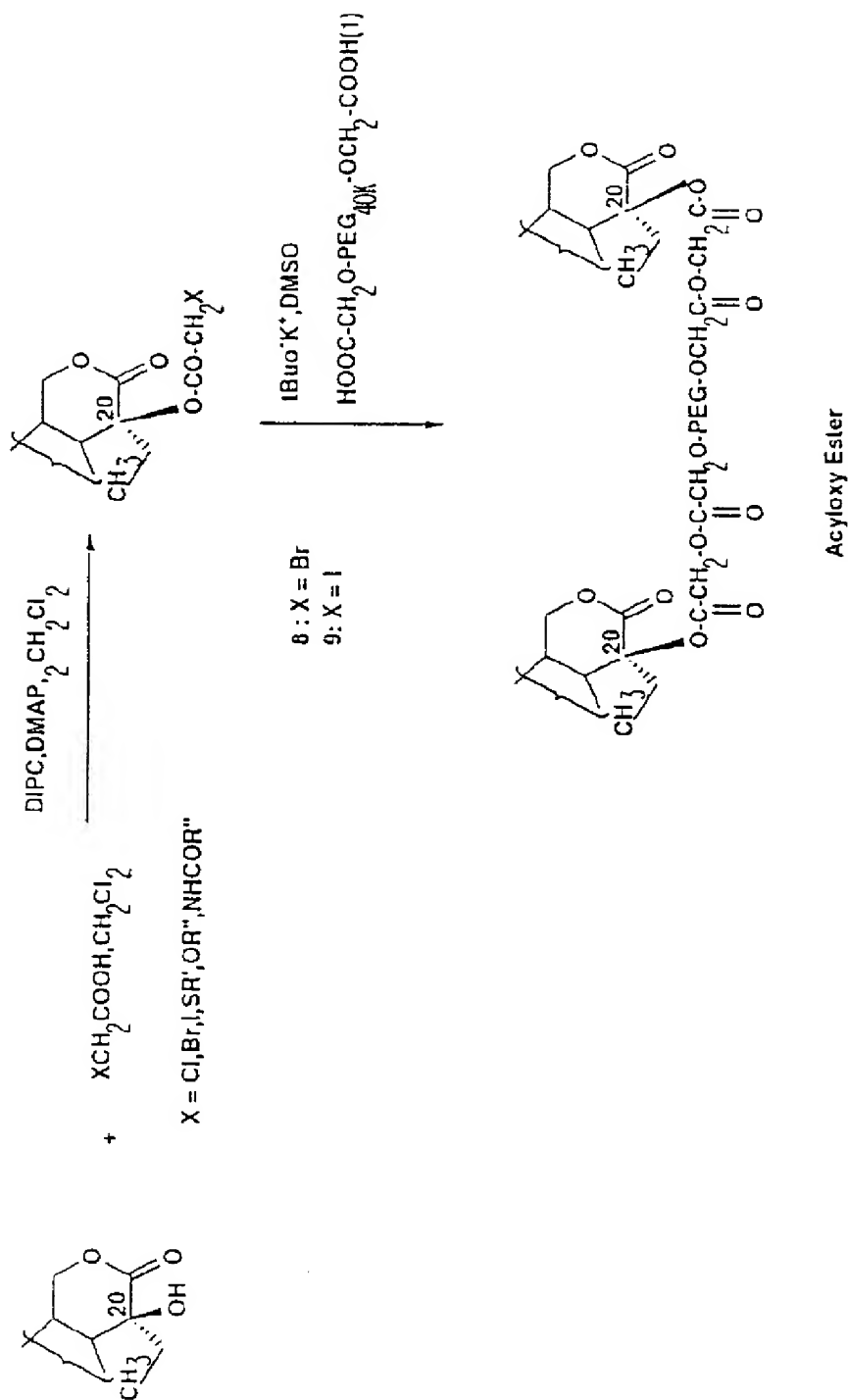


【 図 4 】



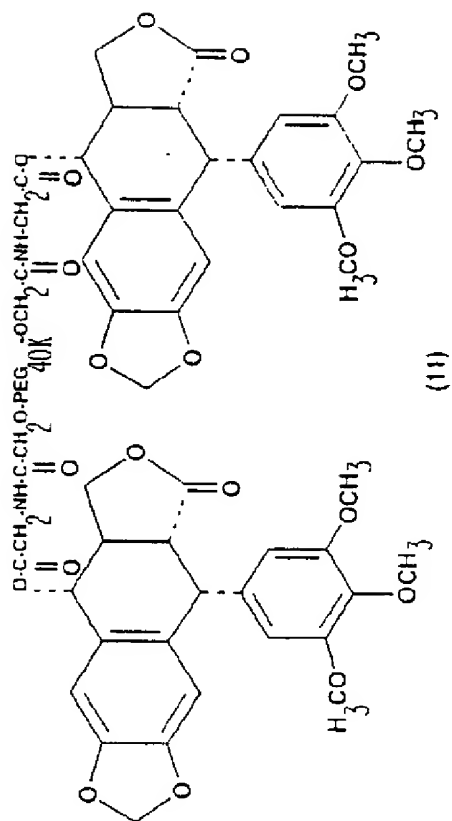
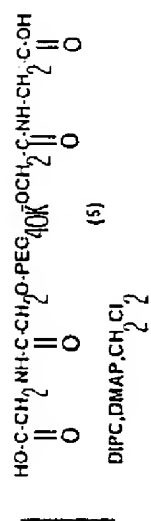
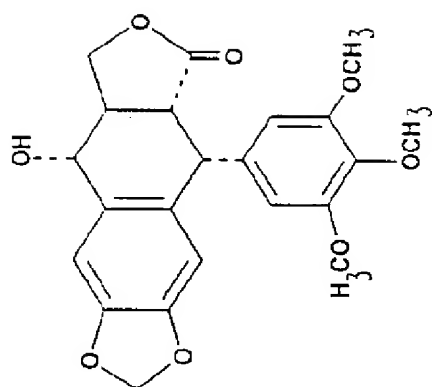
【 図 5 】

FIG. 5



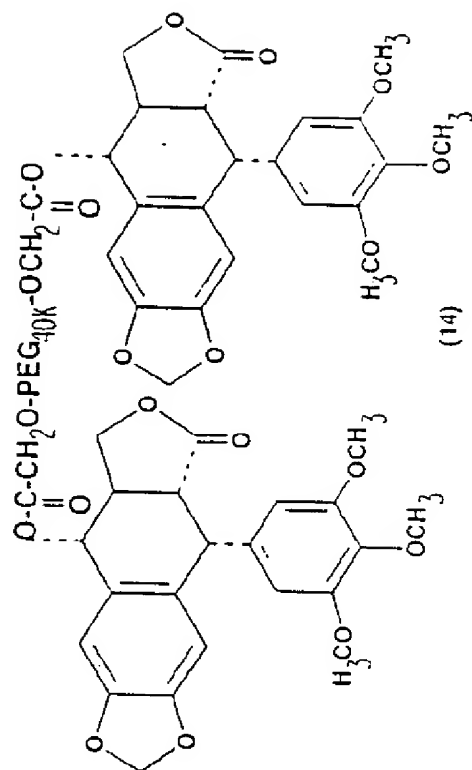
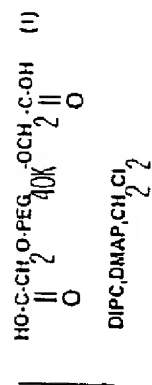
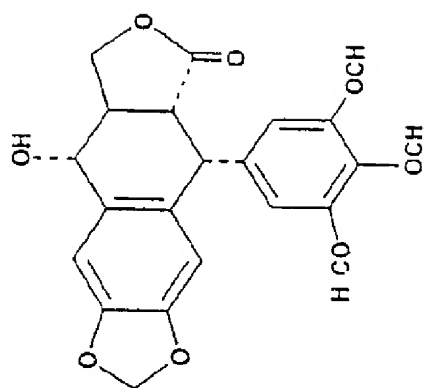
【 図 6 】

FIG. 6



【図7】

FIG. 7



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/01459

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : C07D 491/22; 317/70; 305/14; A61K 31/335
US CL : 546/48; 549/298, 510, 511; 514/449

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 546/48; 549/298, 510, 511; 514/449

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US, A, 4,534,899 (SEARS) 13 AUGUST 1985, SEE ENTIRE DOCUMENT.	17, 29, 35
Y	US, A, 4,644,072 (VYAS ET AL.) 17 FEBRUARY 1987, SEE ENTIRE DOCUMENT.	18, 30
Y	US, A, 5,004,758 (BOEHM ET AL.) 02 APRIL 1991, SEE ENTIRE DOCUMENT.	18, 30, 34
Y	US, A, 5,059,699 (KINGSTON ET AL.) 22 OCTOBER 1991, SEE ENTIRE DOCUMENT.	17, 29, 35
Y	EUR. POLYM. J., VOLUME 19, NUMBER 12, ISSUED 1983, ZALIPSKY ET AL., "ATTACHMENT OF DRUGS TO POLYETHYLENE GLYCOLS", PAGES 1177-1183, SEE PAGES 1178-1180.	17, 29, 35

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to undermine the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"G" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

24 MAY 1996

Date of mailing of the international search report

13 June 1996 (13.06.96)

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

BA K. TRINH

Telephone No. (703) 308-1235

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US96/01459

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	POLYMER PREPRINTS, VOLUME 31, ISSUED 1990, NATHAN ET AL., "POLYETHYLENE GLYCOL-LYSINE COPOLYMERS: NEW BIOCOMPATIBLE POLYMERS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS", PAGES 213-214.	17, 29, 35
Y	J. MED. CHEM., VOLUME 16, NUMBER 5, ISSUED 1973, WEINER ET AL., "POLYETHYLENE GLYCOL DERIVATIVES OF PROCAINE", SEE PAGES 573-574.	17, 29, 35
Y	J. MED. CHEM., VOLUME 24, NUMBER 5, ISSUED 1981, CECCHI ET AL., "SYNTHESIS AND PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF POLY(OXYETHYLENE) DERIVATIVES OF 4-ISOBUTYLPHENYL-2-PROPIONIC ACID (IBUPROFEN)", PAGES 622-625.	17, 29, 35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. application No.
PCT/US96/01459

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-16, 19-28, 31-33, 36-37
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The term "D is a biologically active moiety" is vague and/or indefinite. It would embrace a vast spectrum of various compounds in the art.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN